

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/019818

International filing date: 27 December 2004 (27.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-434035
Filing date: 26 December 2003 (26.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 17 February 2005 (17.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

27.12.2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年12月26日
Date of Application:

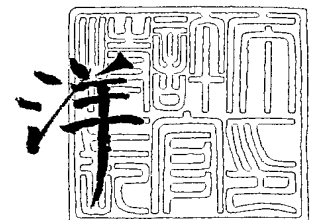
出願番号 特願2003-434035
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP 2003-434035]

出願人 株式会社ジーエスプラッツ
Applicant(s):

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

2005年 2月 4日

小川



出証番号 出証特2005-3006788

【書類名】 特許願
【整理番号】 PGP-0002
【提出日】 平成15年12月26日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 5/00
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都目黒区駒場 3 - 8 - 1 東京大学大学院総合文化研究科生命環境科学系内
 【氏名】 浅島 誠
【発明者】
 【住所又は居所】 広島県広島市南区霞 1 - 2 - 3 広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・先進医療開発科学講座・分子口腔医学・顎顔面外科学内
 【氏名】 岡本 哲治
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県横須賀市稲岡町 8 2 神奈川歯科大学口腔生化学内
 【氏名】 古江 美保
【特許出願人】
 【識別番号】 500299296
 【氏名又は名称】 株式会社ジーエスプラッツ
【代理人】
 【識別番号】 230104019
 【弁護士】
 【氏名又は名称】 大野 聖二
 【電話番号】 03-5521-1530
【選任した代理人】
 【識別番号】 100106840
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 森田 耕司
 【電話番号】 03-5521-1530
【選任した代理人】
 【識別番号】 100105991
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 田中 玲子
 【電話番号】 03-5521-1530
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 185396
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

以下の表 I :

【表 1】

成分	濃度(mg/L)	成分	濃度(mg/L)
L-アラニン	1.78~2.67	イノシトール	13.48~20.22
L-アルギニン	40~60	ニコチン酸アミド	1.8074~2.7111
L-アルギニンHCl	75.8~113.7	ピリドキサルHCl	1.6~2.4
L-アスパラギンH ₂ O	13.002~19.503	ピリドキシンHCl	0.2124~0.3186
L-アスパラギン酸	6.66~9.99	リボフラビン	0.2076~0.3114
L-システインHCl・H ₂ O	7.024~10.536	チアミンHCl	1.868~2.802
L-シスチン2HCl	38.058~57.087	ビタミンB ₁₂	0.273~0.4095
L-グルタミン酸	6.94~10.41	ヒポキサンチン	0.816~1.224
L-グルタミン	439.72~659.58	リノール酸	0.0168~0.0252
グリシン	15.5~23.25	リポ酸 (チオクト酸)	0.042~0.063
L-ヒスチジン	3~30	プロレッシン二塩酸塩	0.0322~0.0483
L-ヒドロキシプロリン	4~6	チミジン	0.146~0.219
L-イソロイシン	52.748~79.122	塩化ナトリウム	5279.8~7919.7
L-ロイシン	54.58~81.87	塩化カリウム	284.72~427.08
L-リジンHCl	73.74~110.61	塩化カルシウム (無水)	86.644~129.966
L-メチオニン	15.896~23.844	硝酸カルシウム4H ₂ O	20~30
L-フェニルアラニン	30.392~45.588	塩化マグネシウム (無水)	11.444~17.166
L-プロリン	10.9~16.35	硫酸マグネシウム (無水)	48.844~73.266
L-セリン	24.9~37.35	リン酸二水素ナトリウム (無水)	43.48~65.22
L-スレオニン	44.42~66.63	リン酸一水素二ナトリウム (無水)	188.408~282.612
L-トリプトファン	7.808~11.712	ブドウ糖 (無水)	1860.4~2790.6
L-チロシン	33.888~50.832	ピルビン酸ナトリウム	0.001~220
L-バリン	43.86~65.79	硝酸第二鉄9H ₂ O	0.04~0.06
グルタチオン	0.2~0.3	硫酸銅5H ₂ O	0.0005~0.00075
パラアミノ安息香酸	0.2~0.3	硫酸第一鉄7H ₂ O	0.1668~0.2502
ビオチン	0.04148~0.06222	硫酸亜鉛7H ₂ O	0.1728~0.2592
パントテン酸カルシウム	1.746~2.619	亜セレン酸ナトリウム	0.000692~0.00348
塩化コリン	4.992~7.488	フェノールレッド	5.248~7.872
葉酸	2.06~3.09		

に示される組成を有することを特徴とする、ES細胞培養用培地を調製するための基礎培地。

【請求項 2】

以下の表 II :

【表 2】

成分	濃度(mg/L)	成分	濃度(mg/L)
L-アラニン	1.78~2.67	葉酸	2.06~3.09
L-アルギニン	40~60	イノシトール	13.48~20.22
L-アルギニンHCl	75.8~113.7	ニコチン酸アミド	1.8074~2.7111
L-アスパラギンH ₂ O	13.002~19.503	ピリドキサルHCl	1.6~2.4
L-アスパラギン酸	6.66~9.99	ピリドキシンHCl	0.2124~0.3186
L-システインHCl・H ₂ O	7.024~10.536	リボフラビン	0.2076~0.3114
L-シスチン2HCl	38.058~57.087	チアミンHCl	1.868~2.802
L-グルタミン酸	6.94~10.41	ビタミンB ₁₂	0.273~0.4095
L-グルタミン	439.72~659.58	ヒポキサンチン	0.816~1.224
グリシン	15.5~23.25	リノール酸	0.0168~0.0252
L-ヒスチジン	3~30	リボ酸 (チオクト酸)	0.042~0.063
L-ヒドロキシプロリン	4~6	プロレッシン二塩酸塩	0.0322~0.0483
L-イソロイシン	52.748~79.122	チミジン	0.146~0.219
L-ロイシン	54.58~81.87	塩化ナトリウム	5279.8~7919.7
L-リジンHCl	73.74~110.61	塩化カリウム	284.72~427.08
L-メチオニン	15.896~23.844	塩化カルシウム (無水)	86.644~129.966
L-フェニルアラニン	30.392~45.588	硝酸カルシウム4H ₂ O	20~30
L-プロリン	10.9~16.35	塩化マグネシウム (無水)	11.444~17.166
L-セリン	24.9~37.35	硫酸マグネシウム (無水)	48.844~73.266
L-スレオニン	44.42~66.63	リン酸二水素ナトリウム (無水)	43.48~65.22
L-トリプトファン	7.808~11.712	リン酸一水素二ナトリウム (無水)	188.408~282.612
L-チロシン	33.888~50.832	ブドウ糖 (無水)	1860.4~2790.6
L-バリン	43.86~65.79	ピルビン酸ナトリウム	0.001~220
グルタチオン	0.2~0.3	硝酸第二鉄9H ₂ O	0.04~0.06
パラアミノ安息香酸	0.2~0.3	硫酸銅5H ₂ O	0.0005~0.00075
ピオチン	0.04148~0.06222	硫酸第一鉄7H ₂ O	0.1668~0.2502
パントテン酸カルシウム	1.746~2.619	硫酸亜鉛7H ₂ O	0.1728~0.2592
塩化コリン	4.992~7.488	フェノールレッド	5.248~7.872

に示される組成を有することを特徴とする、ES細胞培養用培地を調製するための基礎培地。

【請求項 3】

以下の表 I I I :

【表 3】

成分	濃度(mg/L)	成分	濃度(mg/L)
L-アラニン	1.78~2.67	葉酸	2.06~3.09
L-アルギニン	40~60	イノシトール	13.48~20.22
L-アルギニンHCl	75.8~113.7	ニコチン酸アミド	1.8074~2.7111
L-アスパラギンH ₂ O	13.002~19.503	ピリドキサルHCl	1.6~2.4
L-アスパラギン酸	6.66~9.99	ピリドキシンHCl	0.2124~0.3186
L-システインHCl・H ₂ O	7.024~10.536	リボフラビン	0.2076~0.3114
L-シスチン2HCl	38.058~57.087	チアミンHCl	1.868~2.802
L-グルタミン酸	6.94~10.41	ビタミンB ₁₂	0.273~0.4095
L-グルタミン	439.72~659.58	ヒボキサンチン	0.816~1.224
グリシン	15.5~23.25	リノール酸	0.0168~0.0252
L-ヒスチジン	3~30	リボ酸 (チオクト酸)	0.042~0.063
L-ヒドロキシプロリン	4~6	プロレッシン二塩酸塩	0.0322~0.0483
L-イソロイシン	52.748~79.122	チミジン	0.146~0.219
L-ロイシン	54.58~81.87	塩化ナトリウム	5279.8~7919.7
L-リジンHCl	73.74~110.61	塩化カリウム	284.72~427.08
L-メチオニン	15.896~23.844	塩化カルシウム (無水)	86.644~129.966
L-フェニルアラニン	30.392~45.588	硝酸カルシウム4H ₂ O	20~30
L-プロリン	10.9~16.35	塩化マグネシウム (無水)	11.444~17.166
L-セリン	24.9~37.35	硫酸マグネシウム (無水)	48.844~73.266
L-スレオニン	44.42~66.63	リン酸二水素ナトリウム (無水)	43.48~65.22
L-トリプトファン	7.808~11.712	リン酸一水素二ナトリウム (無水)	188.408~282.612
L-チロシン	33.888~50.832	ブドウ糖 (無水)	1860.4~2790.6
L-バリン	43.86~65.79	硝酸第二鉄9H ₂ O	0.04~0.06
グルタチオン	0.2~0.3	硫酸銅5H ₂ O	0.0005~0.00075
パラアミノ安息香酸	0.2~0.3	硫酸第一鉄7H ₂ O	0.1668~0.2502
ビオチン	0.04148~0.06222	硫酸亜鉛7H ₂ O	0.1728~0.2592
パントテン酸カルシウム	1.746~2.619	フェノールレッド	5.248~7.872
塩化コリン	4.992~7.488		

に示される組成を有することを特徴とする、ES細胞培養用培地を調製するための基礎培地。

【請求項 4】

2. 5~4. 5 g/LのHEPES, および所望のpHに調節するために必要な量のNaHCO₃をさらに含む、請求項1-3のいずれかに記載の基礎培地。

【請求項 5】

請求項4記載の基礎培地, インスリン, トランスフェリン, 2-メルカプトエタノール, 2-エタノールアミン, 亜セレン酸ナトリウム, 無脂肪酸ウシ血清アルブミンと複合体化したオレイン酸, およびLIF (白血病抑制因子) を含む, ES細胞培養用培地。

【請求項 6】

請求項 5 記載の E S 細胞培養用培地を用いることを特徴とする， E S 細胞の培養方法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 E S細胞培養用基礎培地

【技術分野】

【0001】

本発明は哺乳動物のE S細胞を培養するための培地を調製するための基礎培地に関する。

【背景技術】

【0002】

胚性幹(E S)細胞は未分化性を示し、生物の発生過程においてインビトロであらゆるタイプの分化した細胞を発生させる能力を有する。E S細胞の自己複製能および未分化性は、ウシ胎児血清を補充した培養用培地を用いて、フィーダー細胞またはL I Fの存在下で維持しうることが知られている(Zandstra, P.W., et al., Biotechnol Bioeng 69, 607-17 (2000))。しかし、現在広く用いられているこのような培養条件においては、E S細胞の分化を解析する際にフィーダー細胞を確実に除去することが困難であり、分化誘導因子の添加による影響を正確に解析することができない。また、フィーダー細胞なしで培養しうるE S細胞株も知られているが、例えば、マウスE S細胞株の1つであるE S-D 3は、フィーダー層なしの培養条件下では自発的に分化する傾向にある。

【0003】

さらに、血清は、アクチビンおよび線維芽細胞成長因子や未知の分化誘導因子の、その量の変動する成分を含む。これらの成分は、種々の物質を外から加えてE S細胞の細胞成長および分化を解析する際に、分析結果に影響を与える可能性がある。また、血清の使用はウイルス、プリオンや未知の因子などの感染の危険性があり、再生医療への応用の際にはリスクを伴う。また、E S細胞の無血清培養条件についての報告もあるが、数代継代すると神経などに分化し、未分化性が維持できない場合がある。

【非特許文献1】 Zandstra, P.W., et al., Biotechnol Bioeng 69, 607-17 (2000)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、フィーダー細胞なしで、未分化性を維持したままE S細胞を長期に培養しうる無血清培養用の培地、およびこのような培地を製造するための基礎培地を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは、特定の組成を有する培地を用いることにより、フィーダー細胞および血清なしで、未分化性を維持したままE S細胞を培養しうることを見いだした。すなわち、本発明は、以下の表I:

【表 4】

成分	濃度(mg/L)	成分	濃度(mg/L)
L-アラニン	1.78~2.67	イノシトール	13.48~20.22
L-アルギニン	40~60	ニコチン酸アミド	1.8074~2.7111
L-アルギニンHCl	75.8~113.7	ピリドキサルHCl	1.6~2.4
L-アスパラギンH ₂ O	13.002~19.503	ピリドキシンHCl	0.2124~0.3186
L-アスパラギン酸	6.66~9.99	リボフラビン	0.2076~0.3114
L-システインHCl・H ₂ O	7.024~10.536	チアミンHCl	1.868~2.802
L-シスチン2HCl	38.058~57.087	ビタミンB ₁₂	0.273~0.4095
L-グルタミン酸	6.94~10.41	ヒポキサンチン	0.816~1.224
L-グルタミン	439.72~659.58	リノール酸	0.0168~0.0252
グリシン	15.5~23.25	リボ酸 (チオクト酸)	0.042~0.063
L-ヒスチジン	3~30	プロレッシン二塩酸塩	0.0322~0.0483
L-ヒドロキシプロリン	4~6	チミジン	0.146~0.219
L-イソロイシン	52.748~79.122	塩化ナトリウム	5279.8~7919.7
L-ロイシン	54.58~81.87	塩化カリウム	284.72~427.08
L-リジンHCl	73.74~110.61	塩化カルシウム (無水)	86.644~129.966
L-メチオニン	15.896~23.844	硝酸カルシウム4H ₂ O	20~30
L-フェニルアラニン	30.392~45.588	塩化マグネシウム (無水)	11.444~17.166
L-プロリン	10.9~16.35	硫酸マグネシウム (無水)	48.844~73.266
L-セリン	24.9~37.35	リン酸二水素ナトリウム (無水)	43.48~65.22
L-スレオニン	44.42~66.63	リン酸一水素二ナトリウム (無水)	188.408~282.612
L-トリプトファン	7.808~11.712	ブドウ糖 (無水)	1860.4~2790.6
L-チロシン	33.888~50.832	ピルビン酸ナトリウム	0.001~220
L-バリン	43.86~65.79	硝酸第二鉄9H ₂ O	0.04~0.06
グルタチオン	0.2~0.3	硫酸銅5H ₂ O	0.0005~0.00075
パラアミノ安息香酸	0.2~0.3	硫酸第一鉄7H ₂ O	0.1668~0.2502
ビオチン	0.04148~0.06222	硫酸亜鉛7H ₂ O	0.1728~0.2592
パントテン酸カルシウム	1.746~2.619	亜セレン酸ナトリウム	0.000692~0.00348
塩化コリン	4.992~7.488	フェノールレッド	5.248~7.872
葉酸	2.06~3.09		

に示される組成を有することを特徴とする、ES細胞培養用培地を調製するための基礎培地を提供する。

【0006】

別の態様においては、本発明は、以下の表II:

【表 5】

成分	濃度(mg/L)	成分	濃度(mg/L)
L-アラニン	1.78~2.67	葉酸	2.06~3.09
L-アルギニン	40~60	イノシトール	13.48~20.22
L-アルギニンHCl	75.8~113.7	ニコチン酸アミド	1.8074~2.7111
L-アスパラギンH ₂ O	13.002~19.503	ピリドキサルHCl	1.6~2.4
L-アスパラギン酸	6.66~9.99	ピリドキシンHCl	0.2124~0.3186
L-システインHCl・H ₂ O	7.024~10.536	リボフラビン	0.2076~0.3114
L-シスチン2HCl	38.058~57.087	チアミンHCl	1.868~2.802
L-グルタミン酸	6.94~10.41	ビタミンB ₁₂	0.273~0.4095
L-グルタミン	439.72~659.58	ヒポキサンチン	0.816~1.224
グリシン	15.5~23.25	リノール酸	0.0168~0.0252
L-ヒスチジン	3~30	リボ酸 (チオクト酸)	0.042~0.063
L-ヒドロキシプロリン	4~6	プロレッシン二塩酸塩	0.0322~0.0483
L-イソロイシン	52.748~79.122	チミジン	0.146~0.219
L-ロイシン	54.58~81.87	塩化ナトリウム	5279.8~7919.7
L-リジンHCl	73.74~110.61	塩化カリウム	284.72~427.08
L-メチオニン	15.896~23.844	塩化カルシウム (無水)	86.644~129.966
L-フェニルアラニン	30.392~45.588	硝酸カルシウム4H ₂ O	20~30
L-プロリン	10.9~16.35	塩化マグネシウム (無水)	11.444~17.166
L-セリン	24.9~37.35	硫酸マグネシウム (無水)	48.844~73.266
L-スレオニン	44.42~66.63	リン酸二水素ナトリウム (無水)	43.48~65.22
L-トリプトファン	7.808~11.712	リン酸一水素二ナトリウム (無水)	188.408~282.612
L-チロシン	33.888~50.832	ブドウ糖 (無水)	1860.4~2790.6
L-バリン	43.86~65.79	ピルビン酸ナトリウム	0.001~220
グルタチオン	0.2~0.3	硝酸第二鉄9H ₂ O	0.04~0.06
パラアミノ安息香酸	0.2~0.3	硫酸銅5H ₂ O	0.0005~0.00075
ビオチン	0.04148~0.06222	硫酸第一鉄7H ₂ O	0.1668~0.2502
パントテン酸カルシウム	1.746~2.619	硫酸亜鉛7H ₂ O	0.1728~0.2592
塩化コリン	4.992~7.488	フェノールレッド	5.248~7.872

に示される組成を有することを特徴とする、ES細胞培養用培地を調製するための基礎培地を提供する。

【0007】

また別の態様においては、本発明は、以下の表III:

【表 6】

成分	濃度(mg/L)	成分	濃度(mg/L)
L-アラニン	1.78~2.67	葉酸	2.06~3.09
L-アルギニン	40~60	イノシトール	13.48~20.22
L-アルギニンHCl	75.8~113.7	ニコチン酸アミド	1.8074~2.7111
L-アスパラギンH ₂ O	13.002~19.503	ピリドキサルHCl	1.6~2.4
L-アスパラギン酸	6.66~9.99	ピリドキシンHCl	0.2124~0.3186
L-システインHCl・H ₂ O	7.024~10.536	リボフラビン	0.2076~0.3114
L-シスチン2HCl	38.058~57.087	チアミンHCl	1.868~2.802
L-グルタミン酸	6.94~10.41	ビタミンB ₁₂	0.273~0.4095
L-グルタミン	439.72~659.58	ヒポキサンチン	0.816~1.224
グリシン	15.5~23.25	リノール酸	0.0168~0.0252
L-ヒスチジン	3~30	リボ酸 (チオクト酸)	0.042~0.063
L-ヒドロキシプロリン	4~6	プロレッシン二塩酸塩	0.0322~0.0483
L-イソロイシン	52.748~79.122	チミジン	0.146~0.219
L-ロイシン	54.58~81.87	塩化ナトリウム	5279.8~7919.7
L-リジンHCl	73.74~110.61	塩化カリウム	284.72~427.08
L-メチオニン	15.896~23.844	塩化カルシウム (無水)	86.644~129.966
L-フェニルアラニン	30.392~45.588	硝酸カルシウム4H ₂ O	20~30
L-プロリン	10.9~16.35	塩化マグネシウム (無水)	11.444~17.166
L-セリン	24.9~37.35	硫酸マグネシウム (無水)	48.844~73.266
L-スレオニン	44.42~66.63	リン酸二水素ナトリウム (無水)	43.48~65.22
L-トリプトファン	7.808~11.712	リン酸一水素二ナトリウム (無水)	188.408~282.612
L-チロシン	33.888~50.832	ブドウ糖 (無水)	1860.4~2790.6
L-バリン	43.86~65.79	硝酸第二鉄9H ₂ O	0.04~0.06
グルタチオン	0.2~0.3	硫酸銅5H ₂ O	0.0005~0.00075
パラアミノ安息香酸	0.2~0.3	硫酸第一鉄7H ₂ O	0.1668~0.2502
ビオチン	0.04148~0.06222	硫酸亜鉛7H ₂ O	0.1728~0.2592
パントテン酸カルシウム	1.746~2.619	フェノールレッド	5.248~7.872
塩化コリン	4.992~7.488		

に示される組成を有することを特徴とする、ES細胞培養用培地を調製するための基礎培地を提供する。

【0008】

別の態様においては、本発明の基礎培地は、2.5~4.5g/LのHEPES、および所望のpHに調節するために必要な量のNaHCO₃をさらに含む。

【0009】

さらに別の態様においては、本発明は、本発明の基礎培地、インスリン、トランスフェリン、2-メルカプトエタノール、2-エタノールアミン、亜セレン酸ナトリウム、無脂肪酸ウシ血清アルブミンと複合体化したオレイン酸、およびLIF（白血病抑制因子）を含む、ES細胞培養用培地を提供する。

【0010】

さらに別の態様においては、本発明は、本発明のES細胞培養用培地を用いることを特徴とするES細胞の培養方法を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本発明においては、フィーダー細胞の非存在下で未分化マウスES細胞を成長させるための無血清合成培地を調製するための基礎培地が提供される。本発明の基礎培地（以下、ESF培地と称する）は、水に、上の表に示される各成分を所定の濃度となるように加え、さらに2.5～4.5g/LのHEPES、および所望のpHに調節するために必要な量のNaHCO₃を加えた後、当該技術分野においてよく知られる方法を用いて滅菌することにより、容易に製造することができる。塩基性アミノ酸等の塩基性成分は、遊離塩基の形で加えても、HCl塩等の塩の形で加えてもよい。本発明の基礎培地に、6因子（6F；インスリン、トランスフェリン、2-ME、2-エタノールアミン、亜セレン酸ナトリウム、無脂肪酸ウシ血清アルブミンと複合体化したオレイン酸）およびLIF（白血病抑制因子）を補充して、本発明のES細胞培養用培地（以下、ESF7培地と称する）を製造する。これらの6因子およびLIFは市販されている。このESF7培地を用いることにより、ES細胞をタイプIコラーゲン被覆フラスコで無血清条件下で維持することができる。あるいは、本発明のES細胞培養用培地は、市販の培地を適宜混合することにより製造してもよい。例えば、市販のRPMI、DMEMおよびF12を1：2：1の割合で混合し、HEPES、NaHCO₃、ピルビン酸、亜セレン酸ナトリウムを添加して作成することにより簡便に製造することができるが、L-ヒスチジンHCl・H₂Oの代わりに、L-ヒスチジンを計23.165g/L添加して使用する方が好ましい。

【0012】

後述の実施例に示されるように、本発明にしたがってESF7培地でマウスES細胞を培養すると、ES細胞は、転写因子Oct3/4、幹細胞マーカーSSEA-1、およびアルカリホスファターゼの発現により表されるように、未分化の表現型を維持した。また、このようにして維持した未分化細胞に、骨形成因子4（BMP4）を加えると上皮様細胞への分化が誘導された。また、アクチビンAを加えると、ES細胞の線維芽細胞様細胞および棘状細胞への分化が促進された。すなわち、本発明にしたがってESF7培地で培養したES細胞は、分化誘導因子の刺激により特定の細胞に分化する能力を維持していた。

【0013】

本発明の基礎培地においては、L-アラニンの濃度は、1.78mg/L～2.67mg/L、好ましくは2.0025mg/L～2.4475mg/L、より好ましくは2.11375mg/L～2.33625mg/Lである。L-アルギニンの濃度は、40mg/L～60mg/L、好ましくは45mg/L～55mg/L、より好ましくは47.5mg/L～52.5mg/Lである。L-アルギニンHClの濃度は、75.8mg/L～113.7mg/L、好ましくは85.275mg/L～104.225mg/L、より好ましくは90.0125mg/L～99.4875mg/Lである。L-アスパラギンH₂Oの濃度は、13.002mg/L～19.503mg/L、好ましくは14.62725mg/L～17.87775mg/L、より好ましくは15.43988mg/L～17.06513mg/Lである。L-アスパラギン酸の濃度は、6.66mg/L～9.99mg/L、好ましくは7.4925mg/L～9.1575mg/L、より好ましくは7.90875mg/L～8.74125mg/Lである。L-システインHCl・H₂Oの濃度は、7.024mg/L～10.536mg/L、好ましくは7.902mg/L～9.658mg/L、より好ましくは8.341mg/L～9.219mg/Lである。L-シスチン2HClの濃度は、38.058mg/L～57.087mg/L、好ましくは42.81525mg/L～52.32975mg/L、より好ましくは45.19388mg/L～49.95113mg/Lである。L-グルタミン酸の濃度は、6.94mg/L～10.41mg/L、好ましくは7.8075mg/L～9.5425mg/L、より好ましくは8.24125mg/L～9.10875mg/Lである。L-グルタミンの濃度は、439.72mg/L～659.58mg/L、好ましくは494.685mg/L～604.615mg/L、より好ましくは522.1675mg/L～577.1325mg/Lである。グリシンの濃度は、15.5mg/L～23.25mg/L、好ましくは17.4375mg/L～21.3125mg/L、より好ましくは18.40625mg/L～20.34375mg/Lである。L-ヒスチジンの濃度は、3mg/L～30mg/L、好ましくは20.8485mg/L～25.4815mg/L、より好ましくは22.00675mg/L～24.32325mg/Lである。

。L-ヒドロキシプロリンの濃度は、4mg/L～6mg/L、好ましくは4.5mg/L～5.5mg/L、より好ましくは4.75mg/L～5.25mg/Lである。L-イソロイシンの濃度は、52.748mg/L～79.122mg/L、好ましくは59.3415mg/L～72.5285mg/L、より好ましくは62.63825mg/L～69.23175mg/Lである。L-ロイシンの濃度は、54.58mg/L～81.87mg/L、好ましくは61.4025mg/L～75.0475mg/L、より好ましくは64.81375mg/L～71.63625mg/Lである。L-リジンH C 1の濃度は、73.74mg/L～110.61mg/L、好ましくは82.9575mg/L～101.3925mg/L、より好ましくは87.56625mg/L～96.78375mg/Lである。L-メチオニンの濃度は、15.896mg/L～23.844mg/L、好ましくは17.883mg/L～21.857mg/L、より好ましくは18.8765mg/L～20.8635mg/Lである。L-フェニルアラニンの濃度は、30.392mg/L～45.588mg/L、好ましくは34.191mg/L～41.789mg/L、より好ましくは36.0905mg/L～39.8895mg/Lである。L-プロリンの濃度は、10.9mg/L～16.35mg/L、好ましくは12.2625mg/L～14.9875mg/L、より好ましくは12.94375mg/L～14.30625mg/Lである。L-セリンの濃度は、24.9mg/L～37.35mg/L、好ましくは28.0125mg/L～34.2375mg/L、より好ましくは29.56875mg/L～32.68125mg/Lである。L-スレオニンの濃度は、44.42mg/L～66.63mg/L、好ましくは49.9725mg/L～61.0775mg/L、より好ましくは52.74875mg/L～58.30125mg/Lである。L-トリプトファンの濃度は、7.808mg/L～11.712mg/L、好ましくは8.784mg/L～10.736mg/L、より好ましくは9.272mg/L～10.248mg/Lである。L-チロシンの濃度は、33.888mg/L～50.832mg/L、好ましくは38.124mg/L～46.596mg/L、より好ましくは40.242mg/L～44.478mg/Lである。L-バリンの濃度は、43.86mg/L～65.79mg/L、好ましくは49.3425mg/L～60.3075mg/L、より好ましくは52.08375mg/L～57.56625mg/Lである。

【 0 0 1 4 】

グルタチオンの濃度は、0.2mg/L～0.3mg/L、好ましくは0.225mg/L～0.275mg/L、より好ましくは0.2375mg/L～0.2625mg/Lである。パラアミノ安息香酸の濃度は、0.2mg/L～0.3mg/L、好ましくは0.225mg/L～0.275mg/L、より好ましくは0.2375mg/L～0.2625mg/Lである。ビオチンの濃度は、0.04148mg/L～0.06222mg/L、好ましくは0.046665mg/L～0.057035mg/L、より好ましくは0.049258mg/L～0.054443mg/Lである。パントテン酸カルシウムの濃度は、1.746mg/L～2.619mg/L、好ましくは1.96425mg/L～2.40075mg/L、より好ましくは2.073375mg/L～2.291625mg/Lである。塩化コリンの濃度は、4.992mg/L～7.488mg/L、好ましくは5.616mg/L～6.864mg/L、より好ましくは5.928mg/L～6.552mg/Lである。葉酸の濃度は、2.06mg/L～3.09mg/L、好ましくは2.3175mg/L～2.8325mg/L、より好ましくは2.44625mg/L～2.70375mg/Lである。イノシトールの濃度は、13.48mg/L～20.22mg/L、好ましくは15.165mg/L～18.535mg/L、より好ましくは16.0075mg/L～17.6925mg/Lである。ニコチン酸アミドの濃度は、1.8074mg/L～2.7111mg/L、好ましくは2.033325mg/L～2.485175mg/L、より好ましくは2.146288mg/L～2.372213mg/Lである。ピリドキサルH C 1の濃度は、1.6mg/L～2.4mg/L、好ましくは1.8mg/L～2.2mg/L、より好ましくは1.9mg/L～2.1mg/Lである。ピリドキシンH C 1の濃度は、0.2124mg/L～0.3186mg/L、好ましくは0.23895mg/L～0.29205mg/L、より好ましくは0.252225mg/L～0.278775mg/Lである。リボフラビンの濃度は、0.2076mg/L～0.3114mg/L、好ましくは0.23355mg/L～0.28545mg/L、より好ましくは0.246525mg/L～0.272475mg/Lである。チアミンH C 1の濃度は、1.868mg/L～2.802mg/L、好ましくは2.1015mg/L～2.5685mg/L、より好ましくは2.21825mg/L～2.45175mg/Lである。ビタミンB 1 2の濃度は、0.273mg/L～0.4095mg/L、好ましくは0.307125mg/L～0.375375mg/L、より好ましくは0.324188mg/L～0.358313mg/Lである。ヒポキサンチンの濃度は、0.816mg/L～1.224mg/L、好ましくは0.918mg/L～1.122mg/L、より好ましくは0.969mg/L～1.071mg/Lである。リノール酸の濃度は、0.0168mg/L～0.0252mg/L、好ましくは0.0189mg/L～0.0231mg/L、より好ましくは0.01995mg/L～0.02205mg/Lである。リポ酸（チオクト酸）の濃度は、0.042mg/L～0.063mg/L、好ましくは0.04725mg/L～0.05775mg/L、より好ましくは0.049875mg/L～0.055125mg/Lである。プロレッシン二塩酸塩の濃度は、0.0322mg/L～0.0483mg/L、好ましくは0.036225mg/L～0.044275mg/L、より好ましくは0.038238mg/L～0.042263mg/Lである。チミジンの濃度は、0.146mg/L～0.219mg/L、好ましくは0.16425mg/L～0.20075mg/L、より好ましくは0.173375mg/L～0.191625mg/Lである。

【0015】

塩化ナトリウムの濃度は、5279.8mg/L～7919.7mg/L、好ましくは5939.775mg/L～7259.725mg/L、より好ましくは6269.763mg/L～6929.738mg/Lである。塩化カリウムの濃度は、284.72mg/L～427.08mg/L、好ましくは320.31mg/L～391.49mg/L、より好ましくは338.105mg/L～373.695mg/Lである。塩化カルシウム（無水）の濃度は、86.644mg/L～129.966mg/L、好ましくは97.4745mg/L～119.1355mg/L、より好ましくは102.8898mg/L～113.7203mg/Lである。硝酸カルシウム 4 H₂O の濃度は、20mg/L～30mg/L、好ましくは22.5mg/L～27.5mg/L、より好ましくは23.75mg/L～26.25mg/Lである。塩化マグネシウム（無水）の濃度は、11.444mg/L～17.166mg/L、好ましくは12.8745mg/L～15.7355mg/L、より好ましくは13.58975mg/L～15.02025mg/Lである。硫酸マグネシウム（無水）の濃度は、48.844mg/L～73.266mg/L、好ましくは54.9495mg/L～67.1605mg/L、より好ましくは58.00225mg/L～64.10775mg/Lである。リン酸二水素ナトリウム（無水）の濃度は、43.48mg/L～65.22mg/L、好ましくは48.915mg/L～59.785mg/L、より好ましくは51.6325mg/L～57.0675mg/Lである。リン酸一水素二ナトリウム（無水）の濃度は、188.408mg/L～282.612mg/L、好ましくは211.959mg/L～259.061mg/L、より好ましくは223.7345mg/L～247.2855mg/Lである。ブドウ糖（無水）の濃度は、1860.4mg/L～2790.6mg/L、好ましくは2092.95mg/L～2558.05mg/L、より好ましくは2209.225mg/L～2441.775mg/Lである。ピルビン酸ナトリウムの濃度は、0.001mg/L～20mg/L、好ましくは50mg/L～170mg/L、より好ましくは100mg/L～120mg/Lである。ピルビン酸ナトリウムは、基本培地中に含めず、後に添加してもよい。硝酸第二鉄 9 H₂O の濃度は、0.04mg/L～0.06mg/L、好ましくは0.045mg/L～0.055mg/L、より好ましくは0.0475mg/L～0.0525mg/Lである。硫酸銅 5 H₂O の濃度は、0.0005mg/L～0.00075mg/L、好ましくは0.000563mg/L～0.000688mg/L、より好ましくは0.000594mg/L～0.000656mg/Lである。硫酸第一鉄 7 H₂O の濃度は、0.1668mg/L～0.2502mg/L、好ましくは0.18765mg/L～0.22935mg/L、より好ましくは0.198075mg/L～0.218925mg/Lである。硫酸亜鉛 7 H₂O の濃度は、0.1728mg/L～0.2592mg/L、好ましくは0.1944mg/L～0.2376mg/L、より好ましくは0.2052mg/L～0.2268mg/Lである。亜セレン酸ナトリウムの濃度は、0.000692mg/L～0.00348mg/L、好ましくは0.000779mg/L～0.00291mg/L、より好ましくは0.000822mg/L～0.00263mg/Lである。亜セレン酸ナトリウムは、基本培地中に含めず、後に添加してもよい。フェノールレッドの濃度は、5.248mg/L～7.872mg/L、好ましくは5.904mg/L～7.216mg/L、より好ましくは6.232mg/L～6.888mg/Lである。

【0016】

本発明の基礎培地に加える HEPES の濃度は、2859.6mg/L～4289.4mg/L、好ましくは3217.05mg/L～3931.95mg/L、より好ましくは3395.775mg/L～3753.225mg/Lである。NaHCO₃ の濃度は、1600mg/L～2400mg/L、好ましくは1800mg/L～2200mg/L、より好ましくは1900mg/L～2100mg/Lである。

【0017】

本発明のES細胞培養用培地を用いることにより、フィーダー細胞を用いることなく、ES細胞を未分化性を維持したまま成長させることができる。このため、種々の因子がES細胞の分化に及ぼす影響を再現性をもって調べることができる。また、ES細胞からの特定の細胞や臓器への分化条件を確立することがより容易になり、予め規定された経路に沿って試験管内（あるいは生体外で）で分化させるようES細胞を誘導することが可能となる。したがって、本発明のES細胞培養用培地は、再生医療への応用に向けたES細胞の研究に有用である。

【0018】

以下に実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

【実施例1】

【0019】

基礎培地の調製

以下の表に示される組成の基礎培地（ESF培地と称する）を作成し、定法にしたがっ

て滅菌した。

【表 7】

成分	濃度(mg/L)	成分	濃度(mg/L)
L-アラニン	2.225	ニコチン酸アミド	2.25925
L-アルギニン	50	ピリドキシルHCl	2
L-アルギニンHCl	94.75	ピリドキシンHCl	0.2655
L-アスパラギンH ₂ O	16.2525	リボフラビン	0.2595
L-アスパラギン酸	8.325	チアミンHCl	2.335
L-システインHCl・H ₂ O	8.78	ビタミンB ₁₂	0.34125
L-シスチン2HCl	47.5725	ヒポキサンチン	1.02
L-グルタミン酸	8.675	リノール酸	0.021
L-グルタミン	549.65	リボ酸 (チオクト酸)	0.0525
グリシン	19.375	プロレッシン二塩酸塩	0.04025
L-ヒスチジン	23.165	チミジン	0.1825
L-ヒドロキシプロリン	5	塩化ナトリウム	6599.75
L-イソロイシン	65.935	塩化カリウム	355.9
L-ロイシン	68.225	塩化カルシウム (無水)	108.305
L-リジンHCl	92.175	硝酸カルシウム4H ₂ O	25
L-メチオニン	19.87	塩化マグネシウム (無水)	14.305
L-フェニルアラニン	37.99	硫酸マグネシウム (無水)	61.055
L-プロリン	13.625	リン酸二水素ナトリウム (無水)	54.35
L-セリン	31.125	リン酸一水素二ナトリウム (無水)	235.51
L-スレオニン	55.525	ブドウ糖 (無水)	2325.5
L-トリプトファン	9.76	ビルビン酸ナトリウム	110
L-チロシン	42.36	硝酸第二鉄9H ₂ O	0.05
L-バリン	54.825	硫酸銅5H ₂ O	0.000625
グルタチオン	0.25	硫酸第一鉄7H ₂ O	0.2085
パラアミノ安息香酸	0.25	硫酸亜鉛7H ₂ O	0.216
ビオチン	0.05185	亜セレン酸ナトリウム	0.000865
パントテン酸カルシウム	2.1825	フェノールレッド	6.56
塩化コリン	6.24	HEPES	3574.5
葉酸	2.575	NaHCO ₃	2000
イノシトール	16.85		

【実施例 2】

【0020】

ES細胞の培養および成長

ES細胞株としては、ES-D3 (ATCC, USA) を用いた。この細胞は、フィーダー細胞なしで培養することができるが、その場合には分化傾向を示すと言われている。ES-D3細胞は、最初は、0.1%ゼラチン被覆プレート (Cell & Molecular Technologies, Inc., Phillipburg, NJ) で、15%

ウシ胎児血清, L-グルタミン, 0.1 mM 2-メルカプトエタノール, ヌクレオシド, 非必須アミノ酸, および LIF を補充したダルベッコ改変イーグル培地 (Complete ES medium; 以下 CEM と称する, Cell & Molecular Technologies, Inc., Philipburg, NJ) で維持した。CEM 培地の組成を以下に示す。

【0021】

【表 8】

ES-101-B
Complete ES Cell Culture Media

Part Number	Component
SLM-220	DMEM ES cell qualified, 400 ml
TMS-002	L-Glutamine 8ml/400 ml media
ES-008	4 ml nucleosides/400 ml media
ES-007	4 ml beta-mercaptoethanol/400 ml media
TMS-001	4 ml NEAA/400 ml media
ES-009	60 ml FBS/400 ml media
LIF	4 ml LIF/400 ml media
TMS-AB2	4 ml Pen/Strep/400 ml media

Base Catalog #	SLM-220	Working pH range	7.0 - 7.4
----------------	---------	------------------	-----------

Component	mg/L
INORGANIC SALTS	
CaCl ₂ (anhyd.)	200
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0.1
KCl	400
MgSO ₄ (anhyd.)	97.67
NaCl	6400
NaHCO ₃	2250
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	125
OTHER COMPONENTS	
D-Glucose	4500
Phenol Red	15
HEPES	---
Sodium Pyruvate	---
VITAMINS	
D-Ca pantothenate	4
Chlorine Chloride	4
Folic Acid	4
i-Inositol	7.2
Niacinamide	4
Pyridoxal-HCl	4
Pyridoxine-HCl	---
Riboflavin	0.4
Thiamine-HCl	4

Component	mg/L
AMINO ACIDS	
L-Arginine-HCl	84
L-Cystine	---
L-Cystine-2HCl	63
L-Glutamine	---
Glycine	30
L-Histidine-HCl·H ₂ O	42
L-Isoleucine	105
L-Leucine	105
L-Lysine-HCl	146
L-Methionine	30
L-Phenylalanine	66
L-Serine	42
L-Threonine	95
L-Tryptophan	16
L-Tyrosine	---
L-Tyrosine-2Na-2H ₂ O	104
L-Valine	94

Base Catalog #	ES-008
----------------	--------

Component	g/L
Cytidine	0.73
Guanosine	0.85
Uridine	0.73
Adenosine	0.8
Thymidine	0.24

【0022】

75 cm² コーニング社プラスチックフラスコに 0.15 mg/ml のコラーゲンタイプ I 溶液を 10 ml 入れ, 乾燥させないように 12 時間処理し, 細胞播種直前に溶液を吸引除去した。ESF 培地に 6 因子 (10 μg/ml ウシインスリン, 5 μg/ml ヒトトランスフェリン, 10 μM 2-メルカプトエタノール, 10 μM 2-アミノエタノール, 10 nM 亜セレン酸ナトリウム, 4 μg/ml 無脂肪酸ウシ血清アルブミンと複合体

化したオレイン酸)ならびに300ユニット/mlのLIF (ESGRO (登録商標), Chemicon International Inc.) を添加した無血清培地 (ESF7培地) を調製した。継代時は, ダルベッコ氏リン酸緩衝液にて洗浄後, 0.001%トリプシン・0.01% EDTAにて細胞を10秒から30秒処理後, ピペッティングにて細胞を分散後, MCDB 153溶液に溶解した0.1%トリプシンインヒビターにてトリプシンを中和し, ESF培地で細胞を集めて, 遠心後, 細胞をESF培地で分散, 再度, 遠心後, ESF7培地に細胞を分散させた。コラーゲン被覆フラスコに, ESF7培地中でES-D3細胞を $5-7 \times 10^3$ /mlの細胞密度で播種し, 数日間培養したところ, 接着性の弱い小型で境界が不明瞭でアルカリフォスファター活性陽性の細胞群がコロニーを形成して増殖した。

【0023】

未分化表現型の判定は以下のようにして行った。細胞のアルカリホスファターゼ活性を検出するために, 細胞を4.5mMクエン酸, 2.25mMクエン酸ナトリウム, 3mM塩化ナトリウム, 65%メタノールおよび4%パラホルムアルデヒドで5分間固定し, 洗浄し, 次にFast Red基質キット (Nichirei Co., Tokyo, Japan) を用いて製造元の指針にしたがって, アルカリホスファターゼを可視化した。

【0024】

OCT3/4蛋白質発現を検出するためには, 細胞をPBS中4%パラホルムアルデヒド (PFA) で4℃で16時間固定した。抗体とのインキュベートの前に, 0.002%トリプシンを室温にて5分処理して細胞の透過性を増加させ, 切片をメタノール中3% H₂O₂で30分間インキュベートすることにより内在性ペルオキシダーゼ活性をブロックした。切片をマウス抗Oct3/4 (Transduction Laboratories, Lexington, KY) で免疫染色し, ペルオキシダーゼコンジュゲート化Simple Stain MAXPO (登録商標) ヤギ抗マウスIgG (NICHIREI Corporation, Tokyo, Japan) および3-アミノ-9-エチルカルバゾールで可視化した。

【0025】

Oct3/4発現のフローサイトメトリ分析を行うためには, ES細胞を, コラーゲンタイプIで被覆した90mmプラスチックプレートでESF7中で, およびRD+2ME+FBs中で, およびゼラチン被覆プラスチックプレートでCEM中で, 3×10^5 細胞を播種した。培養第6日に, 細胞をPBS中トリプシン/EDTAでトリプシン処理し, 次に0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.4) 中1%パラホルムアルデヒドで1時間固定した。細胞をPBS中1%サポニン (Sigma) 中で室温で10分間処理して透過性を増加させた後, 細胞を1mlの10%ヤギ血清 (Nichirei) 中に30分間懸濁し, 遠心分離し, 次に抗Oct3/4マウス抗体 (Transduction Laboratories, Lexington, KY) とともに1時間インキュベートした。細胞を1%ヤギ血清を含有するPBSで3回洗浄し, 次にフルオレセイン (FITC) -コンジュゲート化ヤギ抗マウスIgG抗体 (Immunotech, France) と30分間反応させた。細胞を1%ヤギ血清を含有するPBSで3回洗浄した。再懸濁した細胞をEpic sAltra (Beckman Coulter Co., Miami, FL) で分析した。

【0026】

コラーゲン被覆フラスコでESF7培地中で5日間培養したES-D3細胞と, 0.1%ゼラチン被覆フラスコでCEM中で5日間培養したES-D3細胞について, その細胞の形態を観察することにより表現型を比較した。ESF7培地中で成長したほとんどのES細胞は未分化のままであった。しかし, CEM中の培養物は, 未分化細胞, 線維芽細胞様細胞, 上皮細胞様細胞および神経様細胞の混合物を含んでいた。ES細胞の未分化の性質は, 通常は, 幹細胞マーカー/Oct3/4に対する抗体で染色された細胞の比率を決定することにより確認される。免疫組織化学的染色により, ESF7培地中のほとんどのES-D3細胞はOct3/4蛋白質を発現していたが, CEM中ではより少ない細胞がOct3/4を発現していた。フローサイトメトリを用いて調べたところ, ESF7培地

中の95%以上の細胞がOct 3/4蛋白質を発現していたが、CEM中では85%未満の細胞がOct 3/4を発現していた(図1)。15%FBSおよび2-メルカプトエタノールを添加したRD栄養培地中では、Oct 3/4ポジティブ細胞のパーセンテージは60%未満であった。

【実施例3】

【0027】

LIF濃度の影響

LIFがES-D3細胞の増殖に及ぼす影響を調べた。ES-D3細胞をタイプIコラーゲンで被覆した24-ウエルプレートでESF6(ESF+6因子)で、およびRD+6F中で、およびゼラチンで被覆した24-ウエルプレートでDMEM+15%FBS+2-メルカプトエタノール中で、 5×10^3 細胞/ウエルで播種した。LIFを各ウエルに0, 1, 10, 100, 500, 1000ユニット/mlで加えた。6日間培養した後細胞をコールターカウンターで計数した。

【0028】

LIFはES細胞の自己複製能および未分化性を維持するが、細胞の増殖には影響を及ぼさないことが知られている。しかしながら、図2に示されるように、ESF6培地(黒丸)においては、LIFは明らかに濃度依存的様式でES細胞増殖を刺激した。一方、15%FBSおよび2-メルカプトエタノールを補充したDMEM(黒三角)中では、LIFは細胞増殖にはほとんど影響を及ぼさなかった。すなわち、本発明の化学合成無血清ESF6培地を用いることにより、LIFのマウスES細胞に対するこれまでに知られていない活性を識別することが可能となった。

【0029】

ESF7培地からLIFを除いた場合にも、ES-D3細胞の自発的分化は認められなかった。LIFの非存在下でFBSを培地に加えると、ES-D3細胞は線維芽細胞様細胞、上皮様細胞、および神経様細胞に分化した。このことは、ES-D3細胞がESF6培地中で未分化性を維持していたことを示す。

【実施例4】

【0030】

ES細胞の成長

ES-D3細胞を、タイプIコラーゲンで被覆した24-ウエルプレート(Falcon)にESF7中で、およびゼラチンで被覆した24ウエルプレートにCEM中で、 1×10^4 細胞/ウエルで播種し、細胞の成長を比較した(図3)。ES-D3細胞はCEM中でよく成長した(黒三角; Td=9時間)。ES-D3細胞はESF7培地中ではCEM中よりゆっくりと成長したが(黒丸; Td=11.8時間)、第6日における細胞密度はいずれの培地についてもほとんど同じであった。ES-D3細胞をESF7培地中で1年以上継続して培養しても、細胞はその形態を変化させず、アルカリホスファターゼ活性、Oct 3/4およびSSEA-1を発現し続けた。

【実施例5】

【0031】

ES 129Sv細胞の培養

ESF7培地はES 129Sv細胞の培養に及ぼす影響を調べた。10代継代目の凍結129/SVES細胞(Cell & Molecular Technologies, Inc., Philipburg, NJ)を購入し、これをフィーダー細胞上でCEM中で維持した。129/SVES細胞をタイプIコラーゲナーゼを含むPBS中でピペッティングし、ESF7培地(1000ユニットのLIF/ml)でフィーダー細胞なしでコラーゲン被覆フラスコに接種した。ES 129Sv細胞はゆっくり増殖し、神経様細胞も出現した。しかし、アルカリホスファターゼ活性およびOct 3/4抗体を用いる免疫組織学的発現の測定からES 129Sv細胞がESF7培地中で分化することなく増殖したことがわかった。すなわち、本発明のES細胞培養用培地を用いることにより、通常はフィーダー細胞上で増殖するES細胞もフィーダー細胞なしで増殖することが示された。

。ただし、継代時は、トリプシン EDTAではなく、0.3 ユニット/ml のコラゲナーゼタイプ I A-S を用いて、細胞を分散させた。

【実施例 6】

【0032】

BMP 4 およびアクチビン A による分化誘導

ES-D3 細胞を、ESF 7 中でラミニン被覆プラスチックプレートに接種し、2 日間培養した。次に、培地を RD+5 F 培地（5 因子を補充した RD）に交換した。RD 培地は非 ES 細胞タイプについて一般に用いられている無血清合成培地用の基本培地である。BMP 4 の添加のためには、RD+5 F 培地に fatty acid free-BSA を補充した。

【0033】

アクチビン A を RD+5 F に加えると、ES-D3 細胞の線維芽細胞様細胞への分化が誘導された。BMP 4 を fatty acid free-BSA を補充した RD+5 F に加えると、ES 細胞は上皮様細胞に分化した。これらの結果は、ES-D3 細胞が成長因子に応答して、特定の経路に沿って分化するよう誘導されうること示す。

【図面の簡単な説明】

【0034】

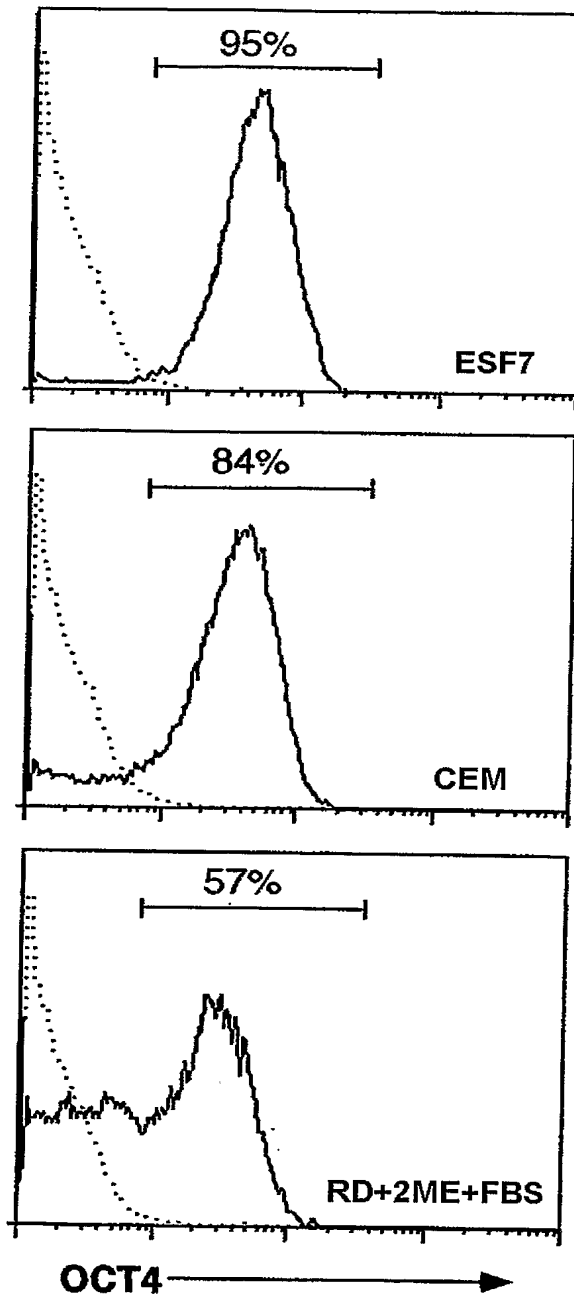
【図 1】 図 1 は、各種培地で培養した ES-D3 細胞における Oct 3/4 発現のフローサイトメトリ分析を示す。

【図 2】 図 2 は、ES-D3 細胞の成長に及ぼす LIF 濃度の影響を示す。

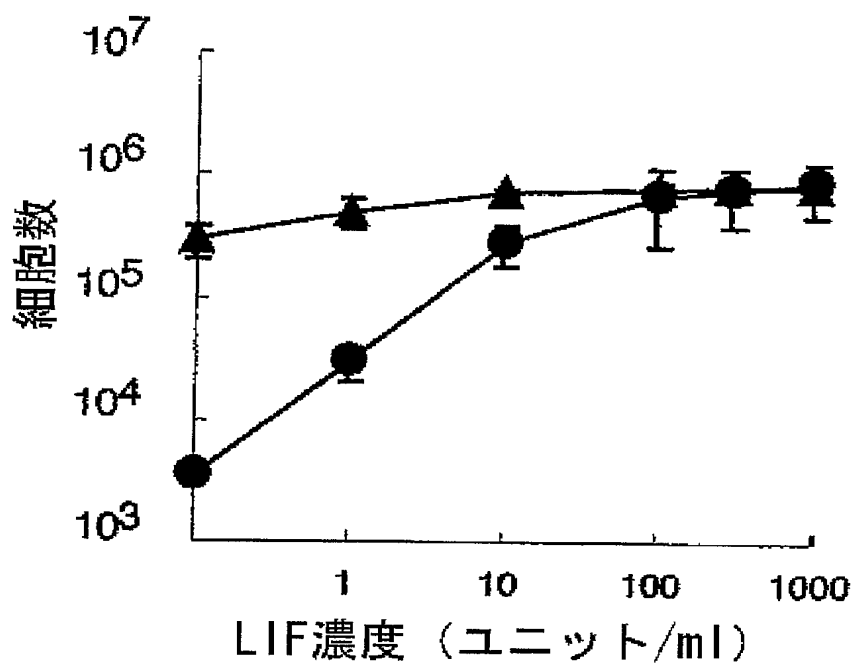
【図 3】 図 3 は、ESF 7 培地および CEM 培地で培養した ES-D3 細胞の増殖を示す。

【書類名】 図面

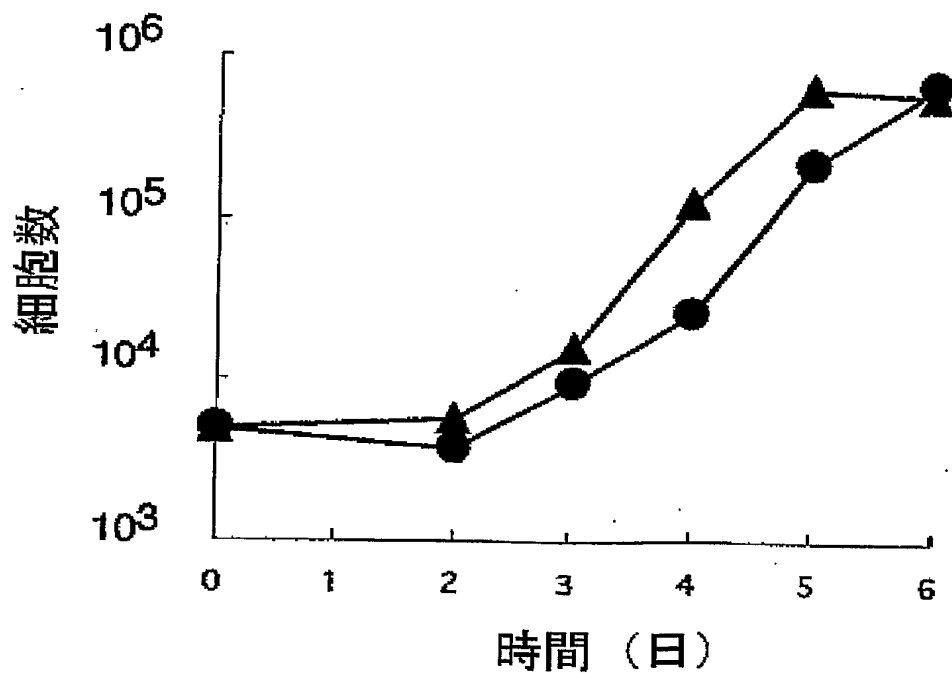
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 フィーダー細胞なしで、未分化性を維持したまま E S 細胞を長期に培養しうる無血清培養用の培地、およびこのような培地を製造するための基礎培地を提供すること。

【解決手段】 以下の表 I :

【表 9】

成分	濃度(mg/L)	成分	濃度(mg/L)
L-アラニン	1.78~2.67	イノシトール	13.48~20.22
L-アルギニン	40~60	ニコチン酸アミド	1.8074~2.7111
L-アルギニン HCl	75.8~113.7	ピリドキサル HCl	1.6~2.4
L-アスパラギン H ₂ O	13.002~19.503	ピリドキシン HCl	0.2124~0.3186
L-アスパラギン酸	6.66~9.99	リボフラビン	0.2076~0.3114
L-システイン HCl · H ₂ O	7.024~10.536	チアミン HCl	1.868~2.802
L-シスチン 2 HCl	38.058~57.087	ビタミン B ₁₂	0.273~0.4095
L-グルタミン酸	6.94~10.41	ヒボキサンチン	0.816~1.224
L-グルタミン	439.72~659.58	リノール酸	0.0168~0.0252
グリシン	15.5~23.25	リボ酸 (チオクト酸)	0.042~0.063
L-ヒスチジン	3~30	プロレッシン二塩酸塩	0.0322~0.0483
L-ヒドロキシプロリン	4~6	チミジン	0.146~0.219
L-イソロイシン	52.748~79.122	塩化ナトリウム	5279.8~7919.7
L-ロイシン	54.58~81.87	塩化カリウム	284.72~427.08
L-リジン HCl	73.74~110.61	塩化カルシウム (無水)	86.644~129.966
L-メチオニン	15.896~23.844	硝酸カルシウム 4 H ₂ O	20~30
L-フェニルアラニン	30.392~45.588	塩化マグネシウム (無水)	11.444~17.166
L-プロリン	10.9~16.35	硫酸マグネシウム (無水)	48.844~73.266
L-セリン	24.9~37.35	リン酸二水素ナトリウム (無水)	43.48~65.22
L-スレオニン	44.42~66.63	リン酸一水素二ナトリウム (無水)	188.408~282.612
L-トリプトファン	7.808~11.712	ブドウ糖 (無水)	1860.4~2790.6
L-チロシン	33.888~50.832	ピルビン酸ナトリウム	0.001~220
L-バリン	43.86~65.79	硝酸第二鉄 9 H ₂ O	0.04~0.06
グルタチオン	0.2~0.3	硫酸銅 5 H ₂ O	0.0005~0.00075
パラミノ安息香酸	0.2~0.3	硫酸第一鉄 7 H ₂ O	0.1668~0.2502
ビオチン	0.04148~0.06222	硫酸亜鉛 7 H ₂ O	0.1728~0.2592
パントテン酸カルシウム	1.746~2.619	亜セレン酸ナトリウム	0.000692~0.00348
塩化コリン	4.992~7.488	フェノールレッド	5.248~7.872
葉酸	2.06~3.09		

に示される組成を有することを特徴とする、E S 細胞培養用培地を調製するための基礎培地、ならびにこの基礎培地より製造される E S 細胞培養用培地。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 4 3 4 0 3 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 0 2 9 9 2 9 6]

1. 変更年月日

2 0 0 0 年 8 月 2 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都中央区日本橋 1 丁目 7 番 1 1 号 日本橋東ビル

氏 名

株式会社ジーエスプラッツ